

多くをこなして、森陽子も
目には見えませんが、し
かし「英語がなくても大
丈夫かな」と在籍生には
強い不安を抱いていま
自分からはうまく話せま
んし、相手の言葉も十分
理解できないので一人出
掛けるのはとても不安で
な。喫茶店に入ってもメ
ーが読めないし何を注文
たものが困ってしまいます。
一階にいる友人が頼んだもの
を「ほくも」と屢々不断に注
せるしかありませんでした。
系は小学校の英語教科書
を前に四苦八苦。大学生の私
が小学1年生よりも劣るので
した。そんなできないだ
らけの自分が特に「親でしか
ら気遣いがめいるのも当然。
一生懸命にやっていると
ですが、自分の能力がこれ

んなことと、不意な笑
は驚きばかりでした。
そんな私を友人たちはよ
く連れ出してくれました。
しめの店に行ったり、渋谷や
新宿の繁華街を歩いたり、そ

れて行きました。運動が脳の
動きを活性化させ、その言
語は不要な染しめる機嫌た
からなのが、誘ってくれた友
人たちの意図は分からずと

にも人生がたいてきたこ
とを察せる貴重な時でした。
ある週末に母と買い物に行
った時のことです。映画の前
売券を購入しようとしたら、
てきました。「『2001年
宇宙の旅』の前売券を枚
ください。これを窓口で言
うのに、母は何度も繰り返
し買いました。そして窓口
に立ちすくみ緊張の中、思
い切って言ってみました。
この瞬間を私は今でもハ
ッキリ覚えています。前売券
を買って、ニコニコ顔で母の元
へ戻りました。私にも「でき
る」という前向きな思いが出
てくるきっかけになりました。
「あのうれしそうな顔は
忘れられない」。母はその後
も思い出しは話してくれま
す。私にも母にも印象深い出
来事でした。(言語聴覚士)

忘れられない瞬間



大学に入学した彼女が友人と米コッパ
ボールを楽しんだら

★ 環境ホルモン

環境ホルモンは、食
物や大気などから人体
の中に入ったもののなか
ら、化学物質が人の健
康に影響するかどうか
問題とされた。化学物質
の種類によって問題と
なる量は異なる。例えば、
ダイオキシンは800
のppb(10億分の一)程度
で1滴を落とす極小レ
ベル。それだけに影響を
極めるのは難しい。

子どもへの影響

リスト作成時は、精
巣がんや乳がん、子宮内
腺症などの関連も疑わ

と指摘する専門家は少な
くない。
約20年前から
化学物質と脳の
発達の関係を研
究する東京大学
医学部の加藤進
昌教授もそう
考える一人だ。
ラットの実験で
は生後間もない
時期に脳の発達
に必要な甲状腺
ホルモンがはん
た。それまでの
動物実験で影響
がないとされた
量の約100分の
1、つまり50分
の1ほど雄は健
並みの行動量に
なると。本来、
雄の行動量が雄
より多い特性が
あり、エストロ
ンが女性
ホルモンとして



活発な議論が展開された国際シンポジウム
二昨年12月、名古屋市中

残った課題 研究これから

しかし大人の影響
は少ないにしても、化学物
質に対する免疫などの
働きがまだ不十分で化
学物質の影響を受けや
すい胎児や乳幼児期に
は、脳神経系の発達が
阻害される可能性がある

の少し不足するだけで
作用した疑いが見られ
た。
加藤さんは実験結果
がそのままにあてはま
るわけではない。しかし
胎児や乳幼児期への影響
を推定するの
は難しいとの批判があ
る。胎児のくその緒から
抽出されるDDE(殺虫
剤)とエストロゲン、

■ 騒ぎ過ぎの批判

一方、行動異常と化学
物質の関係は、研究者
によって実験法が異な
ったり、動物実験から人
への影響を推定するの
は難しいとの批判があ
る。胎児のくその緒から
抽出されるDDE(殺虫
剤)とエストロゲン、

化学物質だけが子ども
の脳の発達に影響する
わけではなく、あまの神
経質になる必要はない。
ただ、少なくとも妊娠中
から乳幼児の時期には、
できるだけ化学物質を
避ける生活を心がける
ことは大事なように思
う。環境ホルモンとい
う人類にとって未知の問
題の解明はまだ終わっ
ていない。

【小島正美】

還付申告するな
ら、早めの準備を心
掛けよう。必要なのは、災害の場合、
会社員なら04年分の

準備を!

取得価格がわかる
もの▽災害関連支
出の領収書を受け取
った保険金額がわか
るもの▽印鑑▽税金



印刷する。
昨年6月からはイン
ターネットを利用して電子
申告ができるようになった。
手続きははやくなった。

150 冬季大会

都港区区政7の冒月十
ルで開かれる。アルビ

II. 分担研究報告

自閉症の関連遺伝子探索に関する研究

分担研究者 佐々木 司 東京大学保健管理センター 助教授

研究要旨: 本研究は、自閉症発症の関連遺伝子をヒトの DNA 試料を用いて探索することを目的に実施した。複雑疾患としての自閉症の疫学と分子遺伝研究への理解を当事者・ご家族に深めて頂くことを1つの目的とした広報活動(冊子の作成・配布、講演会・公開講座など)、それに基づいた対象のリクルートと試料・臨床情報の収集、および候補遺伝子の相関解析(case-control および TDT)を行った。広報活動では予想外に多くのご家族から研究を支持する意見をいただき、このような活動を通じて今後の研究発展の基礎を築くことが可能であることが示された。候補遺伝子の解析は、以前からの試料を合わせて約 300 例を対象に、2q, 7q, 15q などの候補領域の遺伝子、TSC など自閉症での合併頻度が高い疾患の遺伝子を中心に解析を続けている。これまで神経線維症腫の NF1 遺伝子との相関、7q 領域の神経発達遺伝子の一部との相関を示唆する結果が得られている。今後さらに、広報活動・対象リクルートとともに、詳細な検討を続ける予定である。

A. 研究目的

双生児研究などから自閉症には、複数の遺伝子の組み合わせからなる遺伝的要因が極めて強く作用することが明らかにされている。しかしわが国ではこれらの遺伝子を解明する取り組みはほとんど行われてこなかった。本研究は、わが国では数少ない自閉症の分子遺伝研究機関がチームを組み、地域療養施設と連携して、自閉症発症の関連遺伝子を解明することを目的に行った。同時に、単一遺伝子病との違いを含む自閉症の複雑疾患としての疫学について当事者ご家族に理解を深めて頂き、今後の研究の発展基盤を築くことを目的とした。

B. 研究方法

当事者・ご家族に理解を深めて頂く活動は、1) 自閉症の症状・病態・治療の説明に研究の内容説明を加えたカラー冊子を作成・配布、2) 地域の自閉症協会などでの講演、3) 公開講座などを通じて行った。これに基づき協力を

申し出ていただいた当事者・ご家族から DNA 抽出のための血液試料と臨床情報の収集を各地に出張して行った。得られた試料をこれまでに収集した試料に加えて対象とし、相関解析(case-control および TDT)のデザインで候補遺伝子の解析を行った。候補遺伝子としては、1) 欧米の連鎖解析・染色体解析結果に基づく候補染色体領域(2q, 7q, 15q 領域など)の神経発達関連遺伝子、2) 自閉症で合併頻度の高い神経疾患の疾患感受性遺伝子を選定した。

C. 結果と考察

講演会・公開講座には多くの当事者ご家族に参加頂き、予想外に多くの方々から研究を理解・支持するご意見をいただいた(詳細は金生の報告参照)。当事者・ご家族のリクルートと遺伝子の解析は続行中であるが、これまで神経線維症腫の NF1 遺伝子多型との相関、7q 領域の神経発達遺伝子の一部との相関を示唆する結果が得られている。

D. 発表論文

Marui T 他. Neurosci Res (submitted).

Marui T 他. Am J Med Genet, 2004, 131,
43-47.

Marui T 他. Brain Dev, 2004, 26: 5-7.

湊崇暢、佐々木司. 分子精神医学, 2004, 4,
280-5.

自閉症の原因解明と予防、治療法の開発 分子遺伝学的解析

分担研究者 難波 栄二 鳥取大学生命機能研究支援センター 教授

研究要旨: 東海大学、東京大学と共同で自閉症の遺伝的背景の解析を行った。自閉症家系検体(110家系、リンパ芽球様細胞株213株)を用い、自閉症の発症に關与する遺伝子の検索を行った。これら検体よりDNAおよびRNAを抽出し、1)自閉症候補遺伝子のSNPs解析、2)既知のゲノムインプリンティング遺伝子などの遺伝子発現量の解析、3)cDNAマイクロアレイ解析、4)*FMR1*遺伝子におけるCGGリピート数の解析、5)ホメオボックス(HOX)遺伝子群に存在する3塩基リピート数の解析を行った。6)また、正常ヒト脳組織における differentially methylated region(DMR)に着目し、自閉症感受性領域より新規のゲノムインプリンティング遺伝子の検索を試みた。これら解析の結果、1)13遺伝子を解析したが正常コントロールとの差異は認められなかった。2)*DLX5*においてインプリンティングの消去(LOI)が認められた。3)2家系間で比較したが共通して発現量に差のある遺伝子は同定できなかった。4)*FMR1*におけるCGGリピートの異常伸長は認められなかった。5)HOXA群やD群のいくつかにおいて自閉症患者特異的なリピート延長を認めた。HOXA1遺伝子のヒスチジン繰り返しの多型では機能的な異常を来すことを遺伝子導入実験で確認した。6)また2番、7番染色体上の新規インプリンティング遺伝子の同定には至らなかった。さらに、脳特異的なインプリンティング遺伝子を解析する

A. 研究目的

自閉症に關連する遺伝子の同定を目的とし研究を行った。我々は最初に、homeo box A1(*HOXA1*)遺伝子内にヒスチジン繰り返し配列の多型を見出している。これまで自閉症家系特異的であることを疑っていたが、本年度、東京大学の正常コントロールにおいてもリピート数の延長を認めた。トリプレットリピート数がタンパクの局在などにかかわり下流に働く遺伝子群になんらかの影響を与えているのではないかと考え、本年度はさらに他のHOX遺伝子ファミリーのリピート数解析を行った。

また、自閉症とインプリンティング遺伝子の關連が注目されていることから、我々は脳に關連するインプリンティング遺伝子を網羅的に単

離し、その中から自閉症の候補を探る研究戦略を立てている。昨年度までに我々はアレル間で異なるメチル化状態を示すゲノム領域で、インプリンティングの分子機構として中心的な役割を果たすものと考えられている differentially methylated region(DMR)に注目し41個所のCpGアイランドの解析を行いインプリンティング様の発現様式を呈する数種の遺伝子の同定に成功した。本年度は、これまでの連鎖解析により自閉症候補領域とされている染色体領域のうちヒト2番および7番染色体に着目しDMRの検索を行った。

さらに自閉症の遺伝的背景を解明すべく自閉症候補遺伝子群のSNPs解析を行った。また自閉症は一卵性双生児において症状不一

致例が存在するなど、遺伝子の変異のみでは病因の説明が困難な疾患である。よってジェネティックな遺伝子変異のみならずエピジェネティック変異に関する着目し解析を進めた。既知のゲノムインプリンティング遺伝子の発現様式の解析、*HOXA1* 遺伝子等の発現量および発現状態の解析、さらには cDNA マイクロアレイ解析により遺伝子発現異常の検討を行った。

B. 研究方法

東海大学において樹立された自閉症の子供をもつ 110 家系のリンパ芽球様細胞株 (219 検体: 子:93, 母:62, 父:64, 全て日本人) およびリンパ球 (33 検体: 子:3, 母:14, 父:16, 全て日本人) より樹立した芽球化細胞株を培養し、DNA および RNA を抽出した。また、東京大学および鳥取大学で樹立した正常ヒトリンパ芽球様細胞株 (368 検体) を正常コントロールとして用いた。正常ヒト脳組織は脳腫瘍患者より抽出した非がん部を用いた。

HOX 遺伝子群リピート解析

まず NCBI データベースより HOX 遺伝子群のうちトリプレットリピートを有する遺伝子を検索した。一箇所以上リピートが存在した *HOXA1*、*HOXA2*、*HOXA10*、*HOXA11*、*HOXA13*、*HOXD4*、*HOXD8*、*HOXD9*、*HOXD11* および *HOXD13* に存在するヒスチジン、アラニン、グリシンなどのリピート数の解析を行った。(図 1)

1) PCR

PCR 溶液は、10 μ l 中に、DNA (100ng, 50ng, 25ng, 12.5ng, 10ng, 2.5ng, 0.625ng, 0.3125ng, 0.15625ng)、1 \times PCR buffer、0.25mM dNTPs、5pmol 4F プライマー、Cy5-4F プライマー (3pmol, 2pmol, 1pmol)、10pmol 1R プライマー、0.5U Ampli Taq Gold が含まれるように調整した。PCR は iCycler (BIO RAD) を用いて、95 $^{\circ}$ C で 5min 加熱した後、(95 $^{\circ}$ C 1min, 各遺伝子のアンニリング温度 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min) のサイクルを 35 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C 5min で加熱

する条件で行った。PCR 産物はアガロースゲル (1% Agarose S, 1% Nusieve) 電気泳動でそのサイズを確認した。分子量マーカーには Marker4 (ϕ X174/HaeIII) を用いた。PCR 産物は 12 $^{\circ}$ C で保存した。

2) フラグメントサイズの解析

ゲルは 50ml 中に 6% HydroLink LongRanger、6M Urea、1.2 \times TBE (1M Tris-HCl, 0.83M Boric Acid, 10mM EDTA Na₂) が含まれるように調整し、厚さ 0.35mm のものを作成した。PCR 産物 2 μ l に変性剤 8 μ l を加え、95 $^{\circ}$ C で 5min の熱変性処理をした後氷中で急冷却し、その 5 μ l を電気泳動のサンプルとした。ALFred DNA Sequencer (Pharmacia) を用いて、0.6 \times TBE で 1200V、26mA、45W、47 $^{\circ}$ C、480min の条件で電気泳動を行った。泳動後はソフトウェア AlleleLinks を用いて PCR 産物の長さの解析を行った。

3) PCR 産物のサブクローニング

PCR 溶液には、10 μ l 中に 10–30ng DNA、1 \times PCR buffer、0.25mM dNTPs、10pmol 4F プライマー、10pmol 1R プライマー、0.1U Ampli Taq Gold が含まれるように調整した。PCR は iCycler (BIO RAD) を用いて、95 $^{\circ}$ C で 5min 加熱した後、95 $^{\circ}$ C 1min、55 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min、のサイクルを 35 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5min で加熱する条件で行った。この PCR 産物 5 μ l に T-vector 0.5 μ l、2 \times ligation buffer 4 μ l、T₄ ligase 1 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。このサンプル 2 μ l に氷中で融解させた Competent cell 25 μ l を加え、氷中で 20min 放置した後、42 $^{\circ}$ C で 26sec の熱処理を行い、すぐに氷中に戻して 1min おいた。これに S.O.C 500 μ l を加えて 37 $^{\circ}$ C で 60min 保温した後、X-gal 50 μ l、IPTG 5 μ l、S.O.C 45 μ l を塗布した LB-Amp Plate に 200 μ l、300 μ l ずつ塗布して、37 $^{\circ}$ C で一晩保温した。

4) プラスミドの単離と精製

T-vector をもつ白のシングルコロニーを LB-Amp 培地 2ml に植え、37 $^{\circ}$ C で一晩振とう培養した。その後、アルカリ SDS 法の原理によ

る自動プラスミド抽出機 PI-100 Σ (Kurabo)によりプラスミドを抽出した。このプラスミドに 100 μl の TE-Rnase (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA Na2, 50 μg/ml RNase)を加え、37°C, 100rpm で振とうしながら 30-60min インキュベートした後、1.5ml チューブに移した。このサンプルを 12000rpm、5min、室温で遠心し、上清 50 μl をマルチスクリーン PCR プレート (Millipore)に移し、マルチスクリーンバキューム マニホールド (Millipore)を用いて 20-25inch Hg で 5min 上清がなくなるまで吸引した。その後、100 μl の TE を加えて上清がなくなるまで吸引し、この操作を 2 回繰り返した。最後に 50 μl の TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA Na2)を加え、5min シェーカーで攪拌し (100rpm)、溶出した DNA を 4°C で保存した。

5) プラスミドのシークエンシング

シークエンス反応液には、10 μl 中に Terminator Ready Mix 4 μl、精製プラスミド 1 μl、SP6 プライマーまたは T7 プライマーが 4pmol 含まれるように調整した。反応は iCycler (BIO RAD)を用いて、96°C 30sec、50°C 15sec、60°C 4min のサイクルを 25 回繰り返す条件で行った。Multiscreen Dye Terminator Removal Kit (Millipore)を用いて反応液中の余分な蛍光物質を除去し、ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)でそのシークエンスを解析した。

変異 HOXA1 遺伝子の発現実験

1) HOXA1-EGFP 発現ベクターの作成

7 リpeat配列の変異をもつ患者および正常対象から RNA と DNA を分離した。これらを用いて、次のプライマーを用いて HOXA1 cDNA を構築した。5'-TA GAG CTC ATG AAC TCC TTC CTG GAA TAC CCC-3' 5'-AT GGATC CGT AAA GTC TGC GCT GGA GAA GAT GTC-3', 5'-TA GAG CTC ACC ATG GAC AAT GCA AGA ATG AAC TCC-3' and 5'-AT GG ATC CGT GTG GGA GGT AGT CAG AGT GTC TGA -3'.PCR は

Expand Long Template PCR System (Roche)を用いた。PCR 産物は発現ベクター pEGFP-N1 (Clontech)に組み込み、ABI3100 Genetic Analyzer (ABI)で塩基配列を確認した。

2) 細胞への遺伝子導入、免疫染色、蛍光画像解析

HOXA1-EGFP 発現ベクターは Lipofectin (Invitrogen)を用いて COS-7 細胞に導入し発現実験を行った。発現した細胞は 4% paraformaldehyde, で固定し、0.1% Triton X-100 で処理後、1% BSA を含む PBS でブロッキングを行った後に goat anti-HoxA1 antiserum (Santa Cruz)で反応させた。FITC-conjugated anti-goat IgG (Amersham)をさらに反応させ、propidium iodide で核を染色した後に、共焦点レーザー顕微鏡 (MRC1024:Bio-Rad)で観察した。

自閉症患者における FMRI 遺伝子の CGG リピート数の解析

精神遅滞、注意障害を主徴とする脆弱 X 症候群の原因遺伝子である FMRI 遺伝子のエクソン1に存在するトリプレットリピートの伸長の有無を検討した。正常では 6 から 50 の繰り返し回数であるが、保因者では 200 まで伸長が認められ、200 以上の伸長により発症に至る。HOX 遺伝子群の解析と同様に PCR によりリピート領域を増幅し、産物を ALFred DNA Sequencer を用い泳動し解析を行った。

脳特異的インプリンティング遺伝子の単離

1) bisulfite 処理を用いた塩基配列の決定

ヒト脳より抽出したゲノム DNA を用い、bisulfite 処理後に塩基配列を決定することによりメチル化の有無を検討した。これは、非メチル化のシトシン (C) は bisulfite 処理によりウラシル (U) (塩基配列解析ではチミン (T)として検出)に変化するが、メチル化を受けているシトシン (C) は変化しないという原理を用いている。

a) ゲノム DNA の bisulfite 処理

bisulfite 処理には CpGenome Modification kit (Serologicals Corporation)を用いた方法と、3.6M NaHSO₃, 0.6mM HQ (4.04M NaHSO₃, 10mM HQ, 6M NaOH pH 5.0)とゲノム DNA を反応させ、Wizard DNA Clean-Up System column (Promega)を用いて精製し、エタノール沈殿によって DNA を回収する方法を併用した。

b) DMR 候補領域の物理的地図および PCR プライマーの作成

NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)の BLAST を使い、DMR 候補領域の存在するゲノム領域を検索し各染色体上の位置を明らかにした。bisulfite 処理によりメチル化を受ける CpG ジヌクレオチドのシトシン以外は全てチミンに変換されることを想定し BLAST データベースの情報に基づきプライマーを作成した。

c) PCR 法

PCR 反応容量が 10 μ l となるよう MQ 水を 4.65 μ l, dNTPs を 1.25 μ l, 10 \times buffer (各 2mM)を 1.0 μ l, プライマー (10 μ M)を各 1.0 μ l, Ampli Taq Gold (Roche)を 0.1 μ l にゲノム DNA (50ng/ μ l) 1.0 μ l を加えた。これを PCR 法 (95 $^{\circ}$ C で 10 分間 denature した後、95 $^{\circ}$ C 30 秒、プライマーに応じたアニーリング温度で 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒をそれぞれのプライマーに応じたサイクル、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分)によって増幅反応を行った。

d) 電気泳動および PCR 産物のダイレクトシーケンス解析

PCR 産物の電気泳動は 2%のアガロースゲルで行い、エチジウムブロマイドにより染色を行った。PCR 産物の精製には QIA quick Gel extraction kit (QIAGEN) または Multiscreen-PCR (Millipore)を用いた。シーケンス反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Ver.3.0 (Applied Biosystems)を用いて 96 $^{\circ}$ C 30 秒、50 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 4 分 (25 サイクル)で行い、シーケンス解析は 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で行った。

SNP 解析

HOXA3, *HOXA4*, *HOXA10*, *HOXC10*, *HOXD8*, *HOXE5*, transcription factor 7 like 1 (*TCF7L1*), solute carrier family (*SCL25A12*), sodium channel (*SCN2A2*)に存在する SNP を NCBI データベースより選択し、自閉症家系検体 DNA を鋳型とし PCR の後、SSCP、WAVE およびシーケンス解析を行った。確定した条件で自閉症患者と正常ヒトコントロール群を各 30 検体ずつ用いて初期解析を行った後、このうち *SCL25A12* の 2 個所の SNP と *SCN2A2*, *TCF7L1* の各 1 箇所の SNP を用い解析数を増加し genotype frequency と allele frequency, transmission disequilibrium test (TDT)解析を行った。

DLX5 の発現様式の検索

最近レット症候群の原因遺伝子である MeCP2 の下流に働く遺伝子として、母方特異的発現様式を示すインプリンティング遺伝子 distal-less homeobox (*DLX5*)が明らかとなった。レット症候群患者リンパ芽球細胞株ではインプリンティングの消去 (LOI) が生じており GABA の過剰産生が想定される。我々は自閉症リンパ芽球細胞株における *DLX5* 遺伝子の RT-PCR による発現解析を行った。遺伝子の塩基配列情報は National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) データベースより得て、既知の多型を含むように PCR プライマーを設計した。各細胞株からの total RNA 抽出には RNeasy Mini kit (QIAGEN)を用い、DNase I (Takara) 処理を行った後、オリゴ dT プライマー、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。cDNA 合成の確認のため、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)を用いて PCR を行った。PCR 条件は 95 $^{\circ}$ C 45 秒、58 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒を 36 サイクル、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分とした。

DLX2のトリプレットリピート数の解析

DLXファミリーはクラスターを形成し2、7、17番染色体にそれぞれ tail to tail に位置し存在している。これら3染色体領域はいずれも自閉症感受性領域との報告がある。従ってこれらDLXファミリーが自閉症発症になんらかの役割を担うことが想像できる。我々はDLX2に存在するグリニンとヒスチジンリピートに着目し自閉症におけるリピート数の解析を行った。HOX遺伝子群、FMRI遺伝子のトリプレットリピート長解析と同様にPCR産物をALFRedで泳動し解析を行った。

DLXファミリーのインプリンティング解析

近年がんセンター白石らがMBDカラムクロマトグラフィーを用いDMR候補領域を約140箇所同定した。その中にDLX4のCpGアイランドも含まれていた。よって我々はDLX5のみならずファミリーでゲノムインプリンティングを受ける可能性を考え、ヒトリンパ芽球細胞株、正常能組織およびヒト染色体を保持するマウスA9雑種細胞株におけるDNAメチル化状態の解析および発現解析を行った。

HOXA1遺伝子の発現量解析

自閉症との関連が考えられるHOXA1遺伝子の発現量の解析をリアルタイムPCR法により行った。また、HOXA1が片アレル性発現を呈する事を想定した場合、正常コントロールにおいてもリピート延長型が存在しうる。よってリピート数に多型が認められる自閉症家系11検体においてRT-PCR後ALFRedで泳動し発現様式の解析を行った。

cDNAマイクロアレイ解析

自閉症家系検体2例において患者と父親間および患者と母親間でcDNAマイクロアレイ解析を行った。

(倫理面での配慮)

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関

する倫理指針」(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に従い、東京大学医学部、東海大学医学部、鳥取大学医学部の倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

HOX遺伝子群リピート解析

自閉症患者における各遺伝子のリピート数の検索を行い12領域のうちHOXA1、HOXA2、HOXD8、HOXD11およびHOXD13において主に自閉症患者検体においてリピート数の短縮と延長を認めた。(表1、2)

変異HOXA1遺伝子の発現実験

C端にGFPを融合させた7回繰り返しのヒスチジンをもつ変異蛋白は、正常とは異なる細胞内の局在をとる(図1B)。正常では、核から細胞質内への蛋白の移行が見られるが、変異蛋白は核内に蛋白が留まり細胞質への移行が障害されていた。

FMRI遺伝子のCGGリピート数の解析

自閉症家系検体と正常ヒトコントロール群とを比較し顕著な差は認められず、異常に伸長したCGG繰り返し配列は存在しなかった。ほとんどの検体が26から28リピートを持ち、やや伸長した32、33リピート近辺に第二のピークを認めた。(表3、図2)

SNP解析

解析を行った3遺伝子の計4つのSNPは全て自閉症との関連は認められなかった。(表4-8、図3)

DLX5の発現様式の検索

自閉症患者においてDLX5の親由来発現解析が可能な検体は37検体中10検体であった。そのうち3検体において遺伝子発現を認め、1検体においてレット症候群同様にDLX5の両アレル性遺伝子発現を呈していた。さらに興味

深いことに 2 検体については父親由来アレルの発現を認めた。(図 4)

DLX2のトリプレットリピート数の解析

ヒスチジンリピートおよびグリシンリピートをそれぞれ自閉症 102、104 検体について検索したがリピートの増幅は認められずいずれも 7 リピートであった。(図 5、表 9)

DLX ファミリーの刷り込み解析

各遺伝子上流域に存在する CpG アイランドの DNA メチル化状態を検索したがヒト正常繊維芽細胞株および正常ヒト脳組織において全ての遺伝子の CpG アイランドはいずれも低メチル化状態にあった。ヒト染色体を保持するマウス雑種細胞では *DLX4*、*DLX6* においてそれぞれ父方、母方特異的なメチル化を認めた。また、*DLX1*、*DLX2*、*DLX3* および *DLX4* のヒトリンパ芽球および脳組織での発現様式は一部検体において片アレル優位な発現様式を示した。(図 6、表 10)

HOXA1 遺伝子の発現量解析

リアルタイム PCR 解析の結果自閉症患者と正常コントロール群で顕著な発現量の差は認められなかった。さらにリピート長がヘテロであった検体の RT-PCR と ALFRed 解析を行い、自閉症の親検体(父親 2 検体)において片アレル性発現様式を認めた。

cDNA マイクロアレイ解析

患者と父親または母親間で共通して発現量に増減の認められる遺伝子がそれぞれ約 50 認められたが 2 家系間で共通して発現量に差の認められる遺伝子は存在しなかった。(表 11)

2, 7 番染色体に存在する脳特異的インプリンティング候補遺伝子の検索

2q24-q32 領域に存在する T-box brain (*TBR1*)、glutamate decarboxylase (*GAD1*)、*SLC25A12*、methionine aminopeptidase (*MAP1D*)、integrin alpha (*ITGA6*) および

HOXD1 の脳組織における DNA メチル化はいずれも低メチル状態にあった。また、7q22-q31 領域に位置する component of oligomeric golgi complex (*COG5*)、B-cell receptor-associated protein (*BCAP29*)、*SLC26A4*、laminin beta (*LAMB1*)、intracellular membrane associated calcium-independent phospholipase (*IPLA2*)、THAP domain containing (*THAP5*)、dedicator of cytokinesis (*DOCK4*)、interferon-related developmental regulator (*IFRD1*) および wingless-type MMTV integration site family (*WNT2*) の CpG アイランドについても全て非メチル化状態であった。今回検索した遺伝子に関しては脳組織において DMR 様の結果は得られなかった。(図 7)

D. 考察

HOX 遺伝子群リピート解析

今回 *HOXA1* 以外に新たに *HOXA2*、*HOXD8*、*HOXD11* および *HOXD13* においてリピート数の多型を同定した。*HOXA1* の多型では発現実験にて機能的な異常を来すことを見出し、これらが多型が自閉症発症に関連することを疑い今後検体数を増やし解析していく予定である。また、コントロール群と比較し有意な差が認められれば各リピート数を持つ遺伝子を細胞に導入し、さらに細胞発現実験を行いタンパク質の局在を検討することを考えている。

FMRI 遺伝子の CGG リピート数の解析

脆弱 X 症候群の約 20% が小児期には自閉症と診断される。本研究においては自閉症検体、正常検体ともに特にリピートの伸長が存在した検体は認められなかった。脆弱 X 症候群では CGG リピートの伸長することにより生じる DNA メチル化の亢進が遺伝子発現の低下をもたらすと考えられているが、今後リピート伸長を認めなかった検体において DNA メチル化状態の検索を行う必要がある。*FMRI* 遺伝子は他の多くの遺伝子を制御していると考えられるため、

今後、自閉症との関連が疑われる遺伝子と *FMR1* 遺伝子のリピート数との関連などに着目し研究することが重要である。

SNP 解析

フルゲノムでの解析は莫大な時間、労力と費用がかかるため、候補遺伝子に着目した解析が有効であると考えられる。環境要因によるエピジェネティックな遺伝子発現異常の解析と同時に今後も遺伝的解析も継続して行っていくことが求められる。

DLX5 の発現様式の検索

自閉症 1 検体において *DLX5* の LOI が認められた。片アレル性発現を維持していた検体についても通常は母方発現であるのにもかかわらず父方発現を呈していた。これらが自閉症特異的な現象であるのか否か解析検体数を増やし検索する必要がある。MeCP2 は DNA のメチル化領域特異的に結合する機能を有することが知られてきたがレット症候群で報告されたようにクロマチンのループ構造の維持にも重要な役割を果たす。*DLX5* は MeCP2 によりアレル性の発現様式を維持していることから今後 MeCP2 遺伝子の異常にも着目し自閉症検体での変異解析を行う。また、これまでの研究により明らかになっている他の MeCP2 結合領域周辺の遺伝子に関しても発現量の検討を行う。

DLX2 のトリプレットリピート数の解析

ヒスチジン、グリシンともに自閉症検体ではリピート数の増減を認めなかったため、自閉症と関連する可能性は低いものと考えられる。

DLX ファミリーの刷り込み解析

脳組織においては片アレル特異的なインプリンティング様の発現様式を呈した検体が存在した。これらは個体差か脳組織サンプルの摘出部位の違いによるものかどうか定かではない。また少なくとも脳組織においてはその制御に DNA のメチル化が介在する可能性は低い。今

後リンパ芽球において認められた片アレル性の発現様式が個体差であるのか遺伝子の検出方法によるものであるのかを明らかにしていくと同時にリンパ球での DNA メチル化解析が必要である。

HOXA1 遺伝子の発現様式と発現量の解析

ほとんどの患者とその父母では両アレル性発現を呈していたが興味深いことに自閉症の父親検体の 2 例において片アレル性の発現を観察した。よって胎生初期における *HOXA1* のアレル性発現が正常な脳形成に重要である可能性が考えられる。今後正常検体での遺伝子発現様式の解析が必要である。遺伝子の発現量は正常コントロールとほぼ同等であったが *HOXA1* 遺伝子のリンパ芽球における発現は非常に低く検出限界であるのかの検討が必要である。

cDNA マイクロアレイ解析

患者、親間での比較には各個体の年齢や性別などが異なる場合には限界がある。今後一卵性双生児の症状不一致例におけるマイクロアレイ解析が有効な指標となるものと考えられる。また家系数を増やし解析し、数家系において共通し発現量の増減を認める遺伝子の同定を試みる予定である。さらに近年リンパ球の芽球化による細胞培養により DNA のメチル化を異常にさせるとの報告もあるため、今後研究資料としての検体の選択も含めた検討が必要であろう。

2、7 番染色体に存在する脳特異的インプリンティング候補遺伝子の検索

現在さらに解析する遺伝子領域数を増やし順次 CpG アイランドのメチル化の解析を行っている。また今回 DNA メチル化解析を行いプロモーター領域には DMR は存在しないとの結果を得た遺伝子の中にはメチル化によりインプリンティング制御を受けない遺伝子も含まれる可能性が考えられる。

E. 結論

1. *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXD8*, *HOXD11* および *HOXD13* においてリピート数の多型を認め、自閉症と関連する可能性を見出した。*HOXA1* の多型では機能的な異常を見出した。
2. *FMRI* における CGG リピートの異常伸長は認められなかった。
3. SNP 解析を 3 遺伝子の 4 箇所の SNP に関して行ったが自閉症との関連は認められなかった。
4. *DLX5* においてインプリンティングの消去 (LOI) を認めた。
5. 自閉症における *DLX2* のヒスチジン、グリシンリピートの異常伸長は認められなかった。
6. DLX ファミリーはインプリンティング様の発現様式を呈する可能性が考えられた。
7. *HOXA1* はインプリンティングを受ける可能性が考えられる。またその発現量は対照群と比べて顕著な差は認められなかった。
8. cDNA マイクロアレイ解析では 2 家系間で比較したが共通して発現量に差のある遺伝子は同定できなかった。
9. 2 番、7 番染色体上の新規インプリンティング遺伝子の同定には至らなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Maegawa S, Itaba N, Otsuka S, Kamitani H, Watanabe T, Tahimic CG, Nanba E, Oshimura M. Coordinate downregulation of a novel imprinted transcript ITUP1 with PEG3 in glioma cell lines. *DNA Res* 11:37-49, 2004
Hirota T, Ieiri I, Takane H, Maegawa S, Hosokawa M, Kobayashi K, Chiba K, Nanba E, Oshimura M, Sato T, Higuchi S, Otsubo

K. Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status. *Hum Mol Genet* 13, 2959-2969, 2004.

Marui T, Hashimoto O, Nanba E, Kato C, Tochigi M, Umekage T, Kohda K, Kato N, Sasaki T. An association between the neurofibromatosis-1 (NF1) locus and autism in the Japanese population. *Am J Med Genet* 131B, 43-47, 2004.

Feng JH, Yamamoto T, Nanba E, Ninomiya H, Oka A, Ohno K. Novel TSC2 mutations and decreased expression of tuberlin in cultured tumor cells with an insertion mutation. *Hum Mutat* 2004 ;23(4):397

Marui T, Hashimoto O, Nanba E, Kato C, Tochigi M, Umekage T, Kato N, Sasaki T. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) locus in Japanese subjects with autism. *Brain Dev* 26, 5-7, 2004.

Ueta E, Maekawa M, Morimoto I, Nanba E, Naruse I. Sonic hedgehog expression in Gli3 depressed mouse embryo, Pdn/Pdn. *Congenit Anom Kyoto*. 2004 ;44:27-32.

難波栄二 自閉症の遺伝に関する研究: 最近の知見を中心に。分子精神医学 2: 311-316, 2002

2. 学会発表

大塚晋、前川真治、紙谷秀規、渡辺高志、白石昌彦、難波栄二、押村光雄 ヒト 19 番染色体上に存在するゲノムインプリンティング遺伝子のグリオーマ患者脳組織における発現解析 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸) 2004 年 12 月 8 日-11 日

パラギソン ルビギルダ、難波栄二 自閉症の関連する可能性のある HOX 遺伝子変異の発現解析 第 46 回 日本小児神経学会 2004 年 7 月 15 日-17 日 新高輪プリンスホテル国際館パミール(東京)

Eiji Nanba

Molecular genetics of autism: basic and clinical perspectives. Biology of autism: Current research and future perspectives of the research in Japan (symposium). 16th World Congress of the International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions (IACAPAP) 22-26 August 2004, Berlin Germany

延正紅、坂本裕美子、難波栄二、山本兼司、松本英夫、佐々木司、加藤進昌 日本人自閉症における FMR1 および HOXA1 遺伝子の解析 第 12 回 日本精神・行動遺伝医学学会 2004 年 10 月 16 日 帝京大学(東京)

坂本裕美子、延正紅、難波栄二、山本兼司、松本英夫、佐々木司、加藤進昌 日本人自閉症における HOXA1 および FMR1 遺伝子の解析第 28 回 日本小児遺伝学会 2004 年 10 月 16 日 東京女子医科大学

大塚晋、前川真治、白石昌彦、難波栄二、

押村光雄 ヒト 19 番染色体上の新規インプリンティングドメインの同定とグリオーマ細胞株における DNA メチル化状態の解析 日本分子生物学会 第 3 回春季シンポジウム(米子) 2003 年 5 月 12 日-13 日(火)

大塚晋、前川真治、鷺野伸恵、板場則子、白石昌彦、難波栄二、押村光雄 DMRを指標としたヒト新規インプリンティングドメインの検索 日本人類遺伝学会第 48 回大会(長崎) 2003 年 10 月 21 日-24 日

鷺野伸恵、板場則子、大塚晋、前川真治、白石昌彦、難波栄二、押村光雄 アレル特異的メチル化を指標としたヒト新規インプリンティングドメインの検索:22 番染色体の解析 第 26 回日本分子生物学会年会(神戸) 2003 年 12 月 10 日-13 日

板場則子、鷺野伸恵、大塚晋、前川真治、白石昌彦、難波栄二、押村光雄 アレル特異的メチル化を指標としたヒト新規インプリンティングドメインの検索:2 番および 5 番染色体の解析 第 26 回日本分子生物学会年会(神戸) 2003 年 12 月 10 日-13 日

難波栄二、小枝達也、大野耕策、橋本大彦、佐々木司、日本人自閉症におけるホメオティック遺伝子の解析 第 44 回 日本小児神経学会(仙台) 2002 年 6 月 27 日-29 日

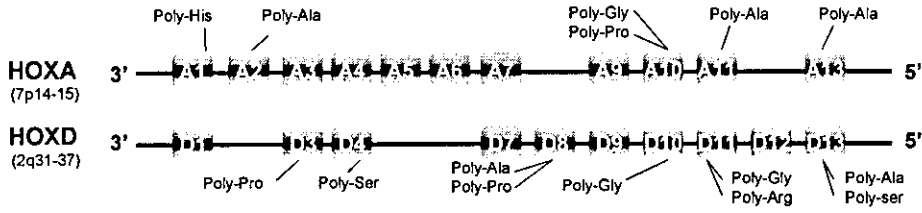


図1 トリプレットリピート配列を持つHOX遺伝子群

表1 HOXファミリーにおけるリピート数の解析

遺伝子	リピート	多型 (解析数)
HOXA1	-HHHHHHHHHH-	+ (110)
HOXA2	-AAAAAATAAA-	+ (32)
HOXA10	-GGGGGGAGGGGGG-	- (30)
	-PPPPQQPPPPPPQPAP-	- (32)
HOXA11	-AAAAAA...GGGG...AAAA...RRRR...SSSS-	- (32)
HOXA13	-AAAAAAAAAAAAAAAA-	- (31)
HOXD4	-SSSSSSSSSCSS-	- (27)
HOXD8	-AAAAAAAA-	+ (24)
	-AAAAA...PPPPHPPPPPPP-	- (31)
HOXD9	-GGGGGGGGG-	- (27)
HOXD11	-GGGPGGGGGAGG...AAAAAAAAAAAA-	+ (28)
HOXD13	-AAAAAAAAAAAAAAAA...SSSSSSS-	+ (27)

表2 HOXA、HOXDにおけるリピート数多型の解析

HOXA1	(bp/bp) wild type	(328/328) (319/328) (325/328) (331/328) (334/328)				計
		-3 His	-1 His	+1 His	+2 His	
東海大学 自閉症(患者)	105	2	0	3	0	110
自閉症(親)	200	4	0	6	1	211
東京大学 正常	312	11	1	12	0	336

HOXD8	(bp/bp) wild type	(423/423) (358/423) (420/423) (423/441)				計
		-65 bp	-3 bp	+18 bp		
東海大学 自閉症(患者)	22	1	1	1	24	
東京大学 正常	32	0	0	0	32	
鳥取大学 正常	26	0	0	0	27	

HOXA2	(bp/bp) wild type	(159/159) (153/159)		計
		-6 bp		
東海大学 自閉症(患者)	31	1	32	
東京大学 正常	32	0	32	
鳥取大学 正常	28	0	28	

HOXD11	(bp/bp) wild type	(387/387) (391/387) (368/387)			計
		+4 bp	-19 bp		
東海大学 自閉症(患者)	27	1	0	28	
東京大学 正常	32	0	0	32	
鳥取大学 正常	28	0	1	27	

HOXD13	(bp/bp) wild type	(329/329) (317/329) (332/332)			計
		-12 bp	+3/+3 bp		
東海大学 自閉症(患者)	25	1	1	27	
東京大学 正常	32	0	0	32	
鳥取大学 正常	27	0	0	27	

表3 FMR1のCGGリピート数解析

リピート数	C	P	N	リピート数	C	P	N
8	0	0	1	30	1	1	8
9	0	0	0	31	1	2	8
10	0	0	0	32	6	5	12
11	0	0	0	33	5	28	58
12	0	0	0	34	2	9	61
13	0	0	1	35	0	0	11
14	0	0	0	36	1	1	9
15	0	0	0	37	0	0	8
16	2	0	1	38	0	0	2
17	0	1	3	39	0	1	1
18	1	0	7	40	0	0	1
19	0	1	2	41	0	0	1
20	0	3	14	42	0	0	0
21	0	4	27	43	0	0	0
22	0	4	18	44	0	0	0
23	0	0	6	45	0	0	1
24	2	11	7	46	0	0	1
25	4	13	12	47	0	0	1
26	45	116	224	48	0	0	0
27	38	91	412	49	0	1	0
28	8	25	202	50	0	0	1
29	0	1	32				
				アレル数	116	318	1153

C: Autism (child) P: Autism (parents) N: Normal

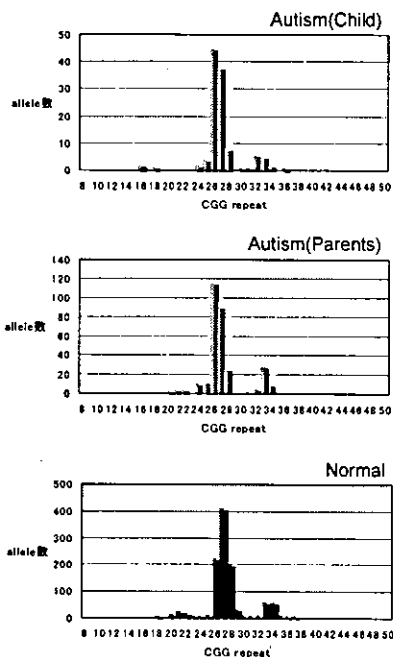


図2 FMR1におけるCGGリピート数の分布

表4 WAVE解析結果(小スケール)

遺伝子	SNP	自閉症	正常
SCN2A2	SC2	59(28)	38(19)
SCL25A12	SL2	26(16)	27(8)
	SL3	45(20)	48(10)
HOXA10	HA102	45(16)	27(18)
HOXA3	HA32	47(11)	27(7)
HOXE5	HB53	37(7)	27(1)
HOXC10	HC101	27(3)	27(8)

()内はヘテロに維持するもの

表5 SSCP解析結果(小スケール)

遺伝子	SNP	アレル型	自閉症	正常	合計
SCN2A2	SC1	t/c	24	14	38
		c	9	6	15
		t	7	7	14
		合計	40	27	67
SCL25A12	SL3	t/c	23	9	32
		c	11	6	15
		t	8	8	16
		合計	42	27	69
TCF7L1	TC1	g/c	15	12	27
		c	16	13	29
		g	1	2	3
		合計	32	27	59
TCF7L1	TC2	a/g	5	3	8
		g	30	24	54
		a	0	0	0
		合計	35	27	62
HOXA10	HA103	t/c	15	8	23
		c	12	10	24
		t	11	9	20
		合計	38	27	65
HOXA4	HA41	g/t	4	8	12
		t	35	18	53
		g	1	1	2
		合計	40	27	67
HOXD8	HD82	g/a	3	1	4
		g	26	26	52
		a	0	0	0
		合計	29	27	58

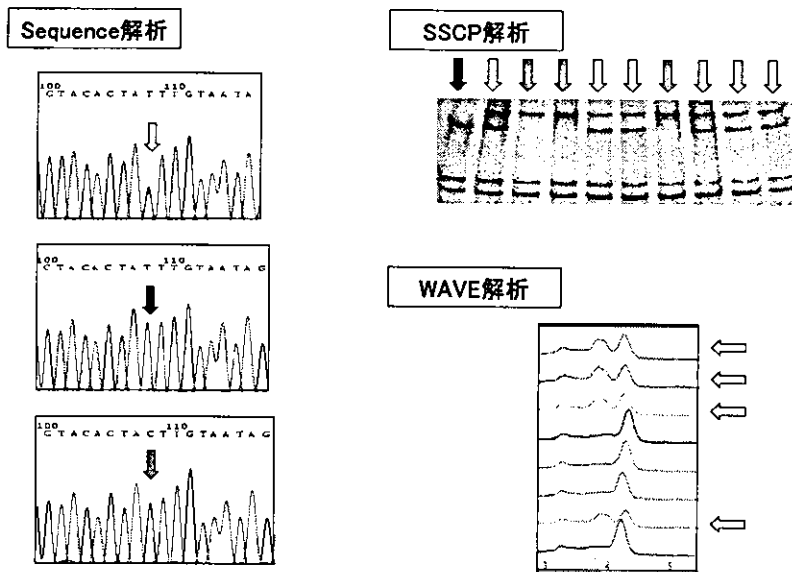


図3 SSCP、WAVEおよびシーケンス解析例(*SLC25A12* SL3)

表6 自閉症105家系における4種のSNPのgenotype frequencyとallele frequency解析

	Genotype Frequencies			Allele Frequencies		
		AA	GA	GG	A	G
SL2	patients	22	62	21	106(0.50)	104(0.50)
	parents	57	104	49	218(0.52)	202(0.48)
SL3	patients	31	53	21	115(0.55)	95(0.45)
	parents	57	102	51	216(0.51)	204(0.49)
SC1	patients	30	54	21	114(0.54)	96(0.46)
	parents	56	107	47	219(0.52)	201(0.48)
TC1	patients	9	38	58	56(0.27)	154(0.73)
	parents	13	80	117	106(0.25)	314(0.75)

SL2:rs3765166, SL3:rs3770448, SC1:rs3769955, TC1:rs3810822

表7 自閉症家系におけるSNPのTDT解析

SNPs	Transmitted*		χ^2	P
SL2	G=54	A=50	0.154	0.695
SL3	T=55	C=45	1	0.317
SC1	T=57	C=49	0.604	0.437
TC1	G=38	C=42	0.2	0.655

* The number of alleles transmitted by heterozygous parents

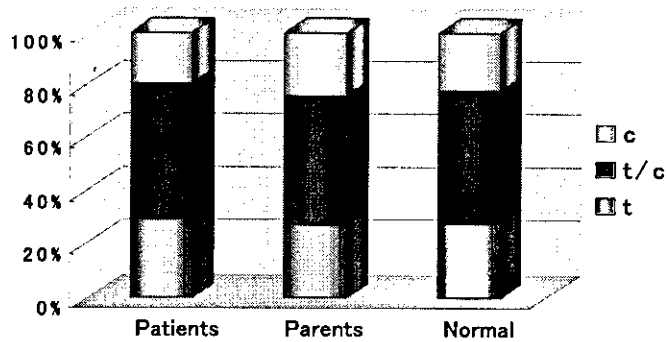
表8 case-control study:

自閉症105家系と正常ヒトにおけるSL3のgenotype frequencyとallele frequency解析

SL3	t	t/c	c	total	t%	c%
patients	32	56	21	109	0.55	0.45
parents	58	105	51	214	0.52	0.48
normal	90	161	72	323	0.45	0.55

$\chi^2=0.887926$ with 4-degrees of freedom (patients,parents and normal) $p=0.926286$

$\chi^2=0.450531$ with 2-degrees of freedom (patients and normal) $p=0.798304$



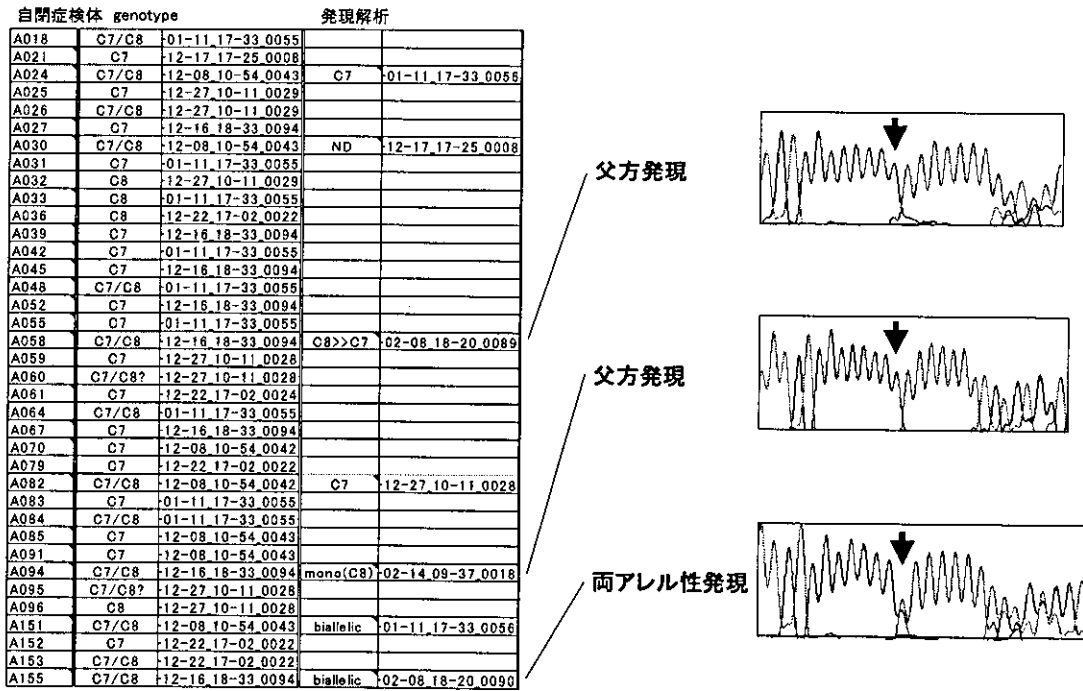


図4 自閉症患者におけるDLX 5遺伝子の発現解析

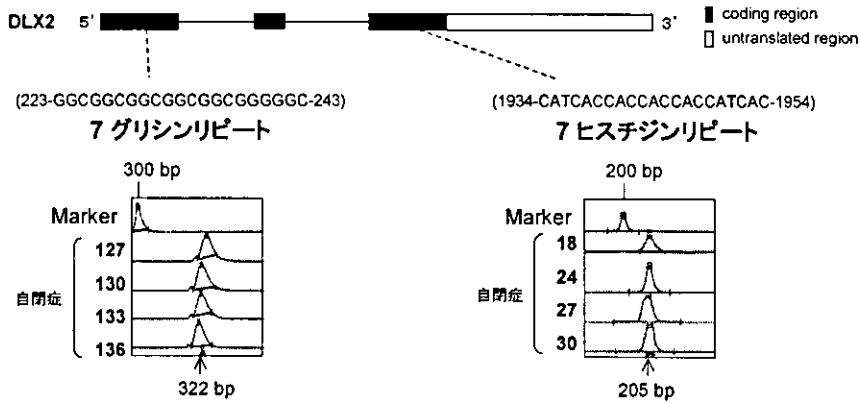


図5 DLX 2に存在するトリプレットリピート長の解析

表9 DLX2のグリシンおよびヒスチジンリピート長の解析結果

リピート	リピート回数	(自閉症解析数)
グリシンリピート	7	(104)
ヒスチジンリピート	7	(102)

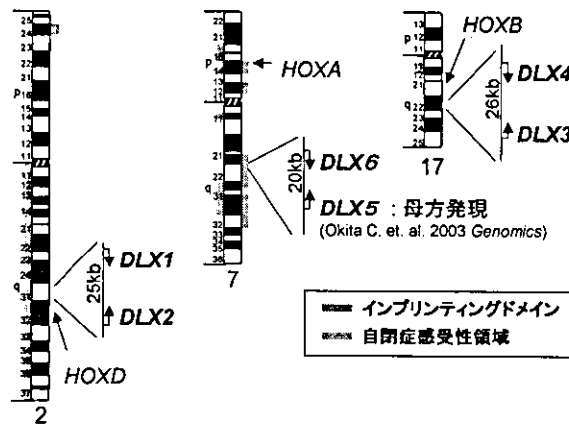


図6 DLX ファミリーの存在する染色体領域

表10 DLXファミリーのインプリンティング解析結果

	fibroblast		LCL		A9 clone		brain	
	methylation	expression	methylation	expression	methylation	expression	methylation	expression
DLX 1	U	ND	ND	mono (1/5)	U	bi	U	mono (1/8)
DLX 2	U	ND	ND	pat? (1/2)	U	bi	U	mono (1/1)
DLX 3	U	ND	ND	mono (2/2)	U	bi	U	ND
DLX 4	U	ND	ND	mono? mat? (3/8)	pat methyl	bi?	U	ND
DLX 5	U	ND	ND	mat	U	mat	U	mono
DLX 6	U	ND	ND	ND	mat methyl	bi	U	mono (3/6)

U: unmethylated
ND: not detected

表11 A164 家系におけるcDNAマイクロアレイ解析により発現量に有意差のあった遺伝子

Name	Definition	Accession Num	Ratio(A164/A185)	Ratio(A164/A189)
FTHL17	Xp21 ferritin, heavy polypeptide-like 17	AF285592	0.308277506	0.486231585
IL1R2	2q12-q22 interleukin 1 receptor, type II	NM_004633	0.356016996	0.354894177
GHRL	3p28-p25 ghrelin precursor	NM_016382	0.407362701	0.48499203
ESR1	6q25.1 estrogen receptor 1	NM_000125	0.441337436	0.47372504
RANBP9	6p23 RAN binding protein 9	AF064606	0.44238994	0.393117803
CGI-121	2q24.3-p2 CGI-121 protein	NM_016058	0.45508998	0.388550212
SERPIN1	6p25 serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10	NM_005024	0.474527417	0.342572337
KCNK1	1q42-q43 potassium channel, subfamily K, member 1	NM_002245	0.482373825	0.480195318
COL4A3BP	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein	NM_031381	0.491719482	0.44081484
C20orf40	chromosome 20 open reading frame 40	AL137077	0.49901143	2.805870585
POLS	5p15 polymerase (DNA directed) sigma	NM_008909	0.499718411	0.440465923
TIMM13	19q13.3 translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)	NM_012458	2.040070118	3.318029579
POLR2F	22q13.1 polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F	NM_021974	2.155181765	2.346937125
SSH1	12q24.11 slingshot 1	AB037719	2.190713584	2.458047328
GLTSCR2	19q13.3 glioma tumor suppressor candidate region gene 2	AL122063	2.204863195	2.226272773
EZF4	16q21-q22 EZF transcription factor 4, p107/p130-binding	NM_001950	2.220433544	2.217746956
IGJ	4q21 immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	M12759	2.22365234	2.802415099
MRPS33	7q32-q34 mitochondrial ribosomal protein S33	NM_018071	2.250370883	2.053659751
SFB5	6q24.2 splicing factor 3b, subunit 5, 10kDa	BC000188	2.273266489	2.482182151
PARK7	1p38.33-p Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	NM_007282	2.308866758	10.35948757
PAM	13q22 protein associated with Myc	NM_015057	2.31937118	2.350204215
ANAPC5	12q24.31 anaphase promoting complex subunit 5	BC006301	2.33975941	4.275895178
SMAP-1	15q26.1 smooth muscle cell associated protein-1	NM_017979	2.358476324	3.918242116
CSDA	12p13.1 cold shock domain protein A	NM_003651	2.373167271	3.495931195
CCL18	17q11.2 chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	NM_002988	2.387491207	2.312166489
LSM6	4q31.22 LSM6 homolog, U8 small nuclear RNA associated (S cerevisiae)	NM_007080	2.520207858	3.855225842
PPFIBP1	12p11.23 PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)	NM_003622	2.541853265	2.110869296
BARHL1	9q34 BarH-like 1 (Drosophila)	AF321618	2.573960927	2.755922574
CCI-27	21q22.12 CCI-27	NM_015955	2.61138091	2.134435602
SPHK1	17q25.2 sphingosine kinase 1	AF238983	2.692826905	3.658860058
HLA-DOA	6p21.3 major histocompatibility complex, class II, DO alpha	NM_002119	2.738385275	2.382066403
DLL3	19q13 delta-like 3 (Drosophila)	NM_018941	2.745021039	3.788429553
CLK1	2q33 CDC-like kinase 1	NM_004071	2.751736734	3.020028172
MRPS11	15q25 mitochondrial ribosomal protein S11	NM_022839	2.863172899	4.316393018
SLC1A5	19q13.3 solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	NM_005628	3.06427549	2.803821777
DAB2	5p13 disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	NM_001343	3.352252846	2.310084296
CHI3L1	1q32.1 chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	AJ251847	3.363340464	2.350547232
PAI-RB-P1	1p31-p22 PAI-1 mRNA-binding protein	BC002488	3.57130183	4.908789658
GDF1	19p12 growth differentiation factor 1	NM_001492	3.588529249	3.101329058
IGBP1	Xq13.1-q1 immunoglobulin (CD79A) binding protein 1	NM_001551	3.598785796	2.740850479
BLR1	11q23.3 Burkitt lymphoma receptor 1, GTP binding protein (chemokine (C-X-C motif) receptor 5)	NM_001718	3.650822285	2.249539078
DKFZP761	9q34 hypothetical protein, DKFZ781H1710	AL136540	3.664434573	2.832977994
DUSP1	5q34 dual specificity phosphatase 1	NM_004417	3.898404744	4.301433768

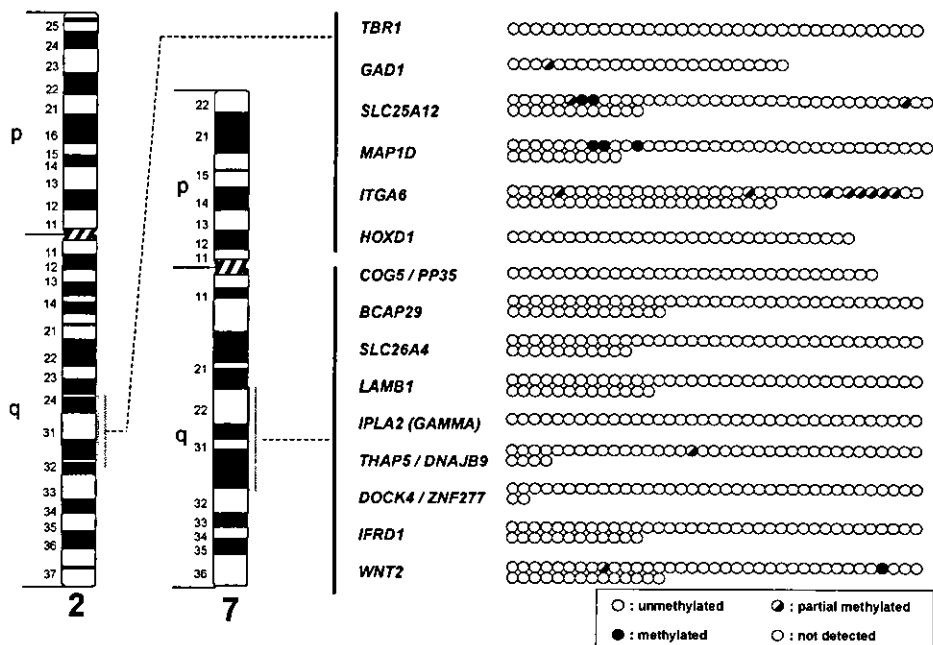


図7 ヒト2,7番染色体の自閉症感受性領域に存在する遺伝子の脳組織におけるDNAメチル化状態